

Aus dem Institut für Klinische Chemie
Direktor: Prof. Dr. med. L. Róka

Kollagenveränderungen
durch Sterilisation und Konservierung
von heterologen Aortenklappen
und homologen Duren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Armin Skuginna
aus Frankfurt/M.

Gießen 1972

Aus dem Institut für Klinische Chemie
Direktor: Prof. Dr. med. L. Róka

Kollagenveränderungen
durch Sterilisation und Konservierung
von heterologen Aortenklappen
und homologen Duren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Armin Skuginna
aus Frankfurt/M.

Gießen 1972

Aus dem Institut für Biologische Chemie
Leiden: Prof. Dr. med. L. Röka

Kolloidveränderungen
durch Zerstörungen und Konzentration
von biologischen Aminosäuren
und homöogenen Tönen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Medizinischen Fakultäts
der Universität Leiden



Dekan: Prof. Dr. med. H. J. Staudinger

Referent: Prof. Dr. med. L. Röka

Correferent: Prof. Dr. F. W. Hehrlein

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

- 1.0 Einleitung
- 2.0 Fragestellung
- 3.0 Klassifizierung der angewandten Sterilisations- und Konservierungsverfahren
- 4.0 Beschreibung der zu testenden Sterilisations- und Konservierungsverfahren
 - 4.1 Lyophilisation
 - 4.2 Beta-Propiolacton und Lyphilisation
 - 4.3 Lyophilisation und nachfolgende Sterilisation mit 2,5 M rad.
 - 4.4 Lyophilisation und Äthylenoxydbegasung
 - 4.5 Cialitkonservierung
- 5.0 Materialgewinnung und Untersuchungsmethoden
 - 5.1 Aufführung von Material und Lösungen
 - 5.2 Vorgang der Präparateaufbereitung
 - a) Kälberaortenklappen
 - b) menschliche Duren
 - c) Systematisierung der verschiedenen Untersuchungsgruppen
 - 5.3 Prinzip der encymatischen Spaltung und Differenzierung in Überstand und Rückstand
 - 5.4 Methodik der Hydroxyprolinbestimmung (Verfahren nach Stegemann)
- 6.0 Ergebnisse
- 7.0 Statische Auswertungen
- 8.0 Tabellenanhang
- 9.0 Diskussion
- 10.0 Zusammenfassung

1.0

E I N L E I T U N G

Unerläßliche Voraussetzung für ein Duratransplantat ist, daß es bei ausreichender Festigkeit und fehlender Sprödigkeit vor allem Gewebsfreundlichkeit zeigt, das heißt: gut und dauerhaft einheilt und schnell vitalisiert wird bei fehlender oder möglichst geringer Gewebsreaktion.

2 Methoden kommen diesem Ziel am nächsten, nämlich die autologe Galeaperiost- und Fascienplastik und die Verwendung homologer lyophilisierter Dura.

Lyophilisierte Dura wurde zuerst um die Mitte der 50-er Jahre verwendet, um Dura-Defekte des Schädels zu decken. Zur Zeit ist der Gebrauch von lyophilisierter Dura, die zusätzlich durch verschiedene Konservierungsverfahren präpariert wird, weit verbreitet. Genannt seien einige Indikationen zur Verwendung lyophilisierter Dura als Gewebeersatz: Deckung von Dura-Lücken, vor allen Dingen die Deckung von Dura-Defekten über der Großhirnkonvexität, seltener an der Basis, vorzüglich bei frischen Hirnverletzungen, traumatischer Spätepilepsie und Schädel- bzw. Hirntumoren mit Durabefall; weiterhin wird die Duraplastik auch zur Entlastung bei gesteigertem intracraniellen Druck verwandt (23, 24).

Als ein weiteres Beispiel der Verwendung lyophilisierter Dura sei die Versorgung und plastische Deckung der Spina bifida in der Kinderchirurgie genannt. Homologe Durastücke können ferner auch

auf größere Gefäßdefekte aufgeklebt werden, was bei traumatischen oder intraoperativen Verletzungen von größeren Gefäßen von Bedeutung sein kann. Aber nicht nur in der Neurochirurgie hat sich lyophilisierte Dura als Gewebeersatz bewährt, auch in der Abdominal- und Thorax-Chirurgie gibt es einige Verwendungsmöglichkeiten.

Der Herzklappenersatz durch Kugel- oder Linsenventile aus Kunststoff, der heute zur Routinebehandlung von erworbenen Herzklappenfehlern gehört, bietet neben zahlreichen Vorteilen auch Nachteile, wie mechanische Hämolyse, thromboembolische Komplikationen, vorzeitigen Materialverschleiß, Auftreten von Infektionen mit Ausreißen der Prothese aus dem Nahtgebiet (Nr. 18, 30).

Eine Alternative zu den Kunststoffventilen bietet ein Klappenersatz durch biologisches Gewebe. Als Wegbereiter einer klinischen Verwendung von biologischem Gewebe zur Beseitigung erworbener Herzklappenvitien seien Lam und Murray genannt (Nr. 14, 20) 1952.

Es wurden eine ganze Reihe von Operationsverfahren entwickelt und dabei die verschiedensten Transplantatformen homologer und autologer Art versucht (30, 31).

Am besten bewährt hat sich schließlich die Übertragung von menschlichen und tierischen Aortenklappen. Dabei ist die Tatsache von Bedeutung, daß Aortenklappen aufgrund ihrer Morphologie und biochemischen Zusammensetzung eine geringe immunologische Aktivität aufweisen, was für die Verwendung vor allem von heterologem Material von Bedeutung ist (5). Daneben zeichnen sich Aortenklappen durch verminderte Einheilungsstörungen, günstigen Ventilmechanismus, feh-

lende mechanische Traumatisierung des Blutes, seltenere thromboembolische Komplikationen und nicht zuletzt durch günstige Herstellungsbedingungen aus (18, 19).

In speziellen Halterungen stehen vorgefertigte Klappentransplantate heute in größerer Menge zur Verfügung (9).

F R A G E S T E L L U N G

Um homologe und heterologe Transplantate für die notwendigen Eingriffe in ausreichender Menge bereitstellen zu können, wurden Konservierungsverfahren entwickelt, die eine längerdauernde Aufbewahrung der Transplantate in einer sogenannten Gewebebank ermöglichen. Da die Transplantatgewinnung nicht unter sterilen Bedingungen erfolgen kann, ist außerdem eine zusätzliche Sterilisation erforderlich.

Es ist in letzter Zeit öfters über Spätveränderungen an biologischen Transplantaten berichtet worden. Über Spätveränderungen hat z. B. D. N. Ross berichtet, der eine überraschend hohe Anzahl von Patienten gefunden hat, die 4 Jahre nach homologem Aortenklappenersatz Insuffizienz-Symptome entwickelten (29). Es lag nahe, die zur Konservierung und Sterilisation angewandten Verfahren für diese Spätveränderungen verantwortlich zu machen. In morphologischen Untersuchungen sind solche Veränderungen beschrieben worden (10, 12), wobei immer wieder eine vakuolige Degeneration, die die interfibrilläre Grundsubstanz betrifft, beobachtet wurde.

Diese morphologischen Veränderungen lassen meist kein genaueres Urteil über den Schädigungsgrad des Gewebes zu. Es erhob sich daher die Frage, welche chemischen Veränderungen im kollagenen Aufbau durch die Konservierungs- und Sterilisationsverfahren hervorgerufen werden, und ob es mit Hilfe eines chemischen Verfahrens gelingt, ein Urteil über den Grad der Kollagenschädigung abzugeben.

In der vorliegenden Arbeit soll nun die Tauglichkeit eines chemischen Verfahrens methodisch untersucht werden, das eine differenzierte Aussage über den Grad der Kollagenschädigung ermöglichen soll.

Insbesondere wird, auch im Vergleich zweier Untersuchungsreihen - einmal mit heterologen Aortenklappen, zum anderen mit menschlicher Dura - auf die Frage eingegangen, ob es möglich ist, quantitativ unterschiedliche Schädigungen an kollagenem Fasergewebe anzuzeigen.

KLASSIFIZIERUNG DER ANGEWANDTEN STERILISATIONS-
UND KONSERVIERUNGSVERFAHREN

Betreffs des Fortbestehens histologischer Zellfunktionen kann man homovitale und homostatistische Transplantate unterscheiden. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht darin, daß bei der homovitalen Transplantation die Zellfunktion auch nach der Überpflanzung erhalten bleibt.

Bei der homostatistischen Transplantation erfolgt zwar ein Einbau des Gewebes in den Organismus, die Zellfunktion wird aber durch den Konservierungsprozeß zerstört (4). Das eingepflanzte Gewebe würde demnach nur als Leitschiene und Gerüst für den Transplantat-Empfänger wirken.

Für die Untersuchungen sowohl an menschlicher Dura als auch an Herzklappengewebe waren als Konservierungsmethoden die Lyophilisation und die Feuchtkonservierung in Cialitlösung ausgewählt worden, wobei bei beiden Verfahren die Zellfunktion des Transplantates nicht erhalten bleibt. Bei der Lyophilisation waren zusätzlich 3 verschiedene Sterilisationsmaßnahmen durchgeführt worden. Eine zusätzliche Sterilisation bei der Konservierung in Cialitlösung erübrigt sich, da das Gewebe gleichzeitig durch den Konservierungsvorgang keimfrei gemacht wird (2).

BESCHREIBUNG DER ZU TESTENDEN STERILISATIONS- UND KONSERVIERUNGSVERFAHREN

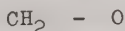
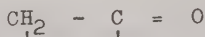
4.1 Prinzip der Lyophilisation

Erstmals wurde die Trocknung frischer Organpräparate unter Vakuum-Bedingungen von Altmann im Jahre 1890 durchgeführt (1). Im Jahre 1935 waren es Flosdorf und Mudd (7), die die Gefriertrocknung mit Erfolg in den klinischen Bereich einführten.

Bei der Lyophilisation wird dem Gewebe durch Einfrieren und darauffolgende Sublimation des Eises unter Vakuumbedingungen das Wasser bis zu einer Restfeuchtigkeit von etwa 0,5 bis 1 % entzogen, wodurch eine unbegrenzte Haltbarkeit erreicht wird. In folgender Weise wird dabei vorgegangen: der erste Schritt zur Lyophilisation besteht in der Einfrierung des Trockengutes. Hierauf wird das Eis unmittelbar in Dampf überführt (Sublimationsvorgang). Der Abtransport des hierbei gebildeten Wasserdampfes erfolgt entweder durch direkten Abpumpvorgang, Kondensation oder Absorption. Diese erste Phase der Sublimation beansprucht etwa $\frac{1}{3}$ der Gesamttrocknungszeit. Es wird dabei die Feuchtigkeit aus dem Gewebematerial bis auf etwa 3 - 6 % des Trockengewichtes entfernt. In der sogenannten 2. Phase, auch als Residualabschnitt bezeichnet, wird die Restfeuchtigkeit bei Zimmertemperatur bis auf 0,5 - 1 % reduziert.

4.2 Beta-Propiolacton- und anschließende Lyophilisation

BPL wurde von Szilagyi und Mitarbeiter (33) als Verfahren zur Sterilisation unsteril entnommener Arterientransplantate in der Klinik eingeführt. BPL ist ein Ester der Hydroxy-Propionsäure



Der Lacton-Ring reagiert leicht mit COOH-, OH-, Phenol-, SH- oder Aminogruppen.

Zur Sterilisation wurden sowohl die Aortenklappenpräparate als auch die Durasegmente eine Stunde in einer einprozentigen Beta-Propiolactonlösung gelagert. Der PH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH-Lösung auf einen Bereich von 7,0 - 7,4 eingestellt (nach Angaben von Szilagyi) (33). Im Anschluß an die Sterilisation wurden die Transplantate in sterilen Behältern dem Lyophilisationsvorgang zugeführt.

4.3 Lyophilisation und nachfolgende Sterilisation mit 2,5 M rad.

Im Jahre 1951 beschrieben Macris, Sloan und (16) Orebaugh die Gammastrahlensterilisation als relativ einfache und wirkungsvolle Methode zur Keimfreimachung von homologen Arteriengeweben. Eine Dosis von 2 Mio rep ist erforderlich, um alle für eine Kontamination von Arterientransplantaten in Frage kommenden Organismen zu zerstören. Die Aortenklappentransplantate und Durasegmente wurden zunächst lyophilisiert. Hierauf wurde die

Bestrahlung an den vakuumdicht-verschlossenen Präparaten mit einer Gesamtdosis von 2,5 M rad. durchgeführt.⁺⁾

4.4 Lyophilisation und Äthylenoxidbegasung

Äthylenoxid ist ein sicheres Sterilisationsmittel. Es wurde 1953 von Hufnagel (11) in die Klinik eingeführt, der es bei der Transplantation von Arteriensegmenten einsetzte. Seither hat man mit der Äthylenoxidbegasung gute Erfahrungen gemacht (3, 21, 25).

Für die Sterilisation der Aortenklappen und Dura-segmente wurde ein Gasgemisch von 10 % Äthylenoxid und 90 % CO₂ verwandt. Das Gasgemisch wurde dem flüssigen Äthylenoxid vorgezogen, da jenes zu feuergefährlich ist. Die Äthylenoxidbegasung mit anschließender Lyophilisation wurde mit einer Gefriertrocknungsanlage durchgeführt, die nach den Vorstellungen von Hehrlein (8) entwickelt worden war. Mit dieser Anlage zur routinemäßigen Zubereitung chirurgischen Transplantationsmaterials war das Problem technisch gelöst worden, einmal eine sichere Sterilisation zu erzielen mit darauffolgender optimaler Gefriertrocknung und schließlich einen einfachen und dauerhaften Verschlußmechanismus für die Rezipienten der Transplantate zu schaffen.

⁺⁾ Die Gammastrahlensterilisation wurde von der Fa. B. Braun, Melsungen, durchgeführt

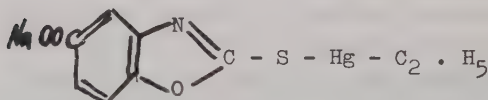
4.5 Cialitkonservierung

Daß Quecksilberverbindungen bakterizid und fungizid wirken, ist schon seit längerer Zeit bekannt. Histologische Untersuchungen zeigten, daß durch die Konservierung mit verschiedenen Quecksilberverbindungen zum Teil unterschiedliche Schädigungen der Gewebe verursacht werden; so fanden sich u. B. bei Merthiolat-konservierten Gefäßen erhebliche Gewebeschädigungen.

Als ein günstiges Konservierungsmittel hat sich schließlich 2-äthylmercuri-mercapto-benzoxazol-5-carbonsaures Natrium (Cialit) erwiesen.

Es war vor allem Carpentier (2), der sich mit Untersuchungen über die Konservierungseigenschaften von Cialit befaßte und der auch eine Konservierungslösung mit der Grundsubstanz Cialit entwickelte, die bald klinische Anwendung fand.

Strukturformel von Cialit:



Die Beigabe von Phenoloot in der eigentlichen Konservierungslösung ermöglicht es, durch einen Farbumschlag von Orangerot in braun-violett eine Änderung des physikalisch-chemischen Gleichgewichtes zu erkennen. Solch eine Änderung kann durch autolytische Vorgänge oder eine bakterielle Kontamination eintreten, was bei einer Konservierung über einen größeren Zeitraum der Fall sein kann (die Konservierungslösung sollte daher in bestimmten Zeitabständen erneuert werden).

Eine PH-Verschiebung wird durch das Auftreten von alkalischen Spaltprodukten bei autolytischen Vorgängen und bakterieller Kontamination erklärt.

In dieser Arbeit wurde die von Carpentier und Audhert entwickelte Konservierungslösung nach den Originalangaben verwendet.

5.0

MATERIALGEWINNUNG UND UNTERSUCHUNGSMETHODEN

5.1 Aufführung von Material und Lösungen

Material:

=====

Kälberaorten und menschliche Duren

L (-) Hydroxyprolin (Merck 4506)

Chloramin T (Merck 2426)

4-Dimethylaminobenzaldehyd (Merck 3057)

Perchlorsäure, 4 M (durch Verdünnung aus HClO_4 70 %, Merck 519)

Trypsin (Serva 37260)

Lösungen:

=====

Citrat-Acetat-Puffer pH 6

50 g Zitronensäure . H_2O (Merck 244)

120 g Natrium-Acetat . 3 H_2O (Merck 6495)

34 g NaOH

12 ml Eisessig ad 1000 ml redest. Wasser

Chloramin T-Lösung

2,82 g Chloramin T

40 ml redest. Wasser

60 ml Äthylenglycolmonomethyläther (Merck 858)

100 ml Citrat-Acetat-Puffer.

p-Dimethylaminobenzaldehyd

10 g in 100 ml Äthylenglycolmonomethyläther lösen
1 % β -Propiolacton Lösung in Wasser

Cialitlösung nach Carpentier

Stammlösung:

24,2 g Trishydroxymethylaminomethan
23,2 g Maleinsäure aufgefüllt auf 1000 ml redest.
Wasser, welches vorher zur Entfernung des CO_2 zum
Sieden gebracht worden ist.

Eigentliche Konservierungslösung:

250 ml Stammlösung
240 ml 0,2 N Natriumbicarbonat
0,01 g 2-Äthylenmercurimercaptobenzoxazol-5-
carbonsaures Natrium
0,05 g Phenolrot
ad 1000 ml redest. Wasser

Trypsin-Puffer pH 8

Zu 100 ml 1 N Ameisensäure wird 1 N Ammoniaklösung
unter Rühren, bis pH 8 erreicht ist, zugesetzt.
In 50 ml Puffer werden jeweils frisch 100 mg
Trypsin gelöst.

Antibiotika-Heparin-Lösung

1 g Streptomycin und 10000 E Heparin in 1 l physiol.
NaCl-Lösung.

5.2 Vorgang der Präparateaufbereitung

a) Kälberaortenklappen

Je 20 Kälberaortenklappen wurden bis späte-
stens 6 Stunden nach Schlachtung der Tiere vom
anhängenden Gewebe freipräpariert und in einzelne

Aortenfragmente zerlegt. Darauf folgte Aufbewahrung bis 12 Stunden in einer NaCl-Streptomycin-Heparinlösung. Die anschließende Weiterverarbeitung mit den zu testenden Konservierungs- und Sterilisationsverfahren war die gleiche wie bei den Dura-Gruppen.

b) Menschliche Dura

Menschliche Duren, die frühzeitig nach dem Tode entnommen worden waren, wurden zunächst ebenfalls für 12 Stunden in einer NaCl-Streptomycin-Heparinlösung aufbewahrt.

c) Systematisierung der verschiedenen Behandlungsarten

Die so vorbehandelten Kälberaortenklappen und Duren wurden in je 6 Gruppen unterteilt und unterschiedlich weiter verarbeitet. Es kamen somit je 6 folgende Gruppen zur Darstellung:

1. Sofortige Verarbeitung des Materials ohne Anwendung von Konservierungs- und Sterilisationsverfahren, Nativ-Gruppe zur Kontrolle.
2. Lyophilisation ohne zusätzliche Sterilisationsverfahren.
3. Lyophilisation und Beta-Propiolactonbehandlung.
4. Lyophilisation und 2,5 M rad.
5. Äthylenoxid und Lyophilisation
6. Cialitkonservierung.

Die einzelnen Sterilisations- und Konservierungsverfahren wurden bereits vorher beschrieben. Zeitlich erfolgte die Äthylenoxidbegasung vor der Lyophilisation für die Einwirkungsdauer von 12 Stunden, bei der Beta-Propiolactonbehandlung wurden die Präparate ebenfalls vor der Lyophilisation 1 Stunde lang in eine einprozentige Beta-Propiolacton-Lösung eingelegt. Die Gammastrahlen-Sterilisation wurde erst nach der Gefriertrocknung mit einer Gesamtdosis von 2,5 Mrad durchgeführt.

Bei der Cialitkonservierung mußten die Präparate für 4 Wochen in einer äquilibrierten Cialitlösung nach der Methode Carpentier-Audhoui eingelegt werden.

5.3 Prinzip der enzymatischen Spaltung und Differenzierung in Überstand und Rückstand

Bei der enzymatischen Spaltung geht man von der Vorstellung aus, daß natives Kollagen durch Verdauungsproteasen kaum gespalten wird (Rapoport, 27).

Denaturiertes Kollagen verliert dagegen sein ursprüngliches Molekulares Gefüge und wird für Verdauungsproteasen wie Trypsin leicht angreifbar.

Unter der Voraussetzung, daß die verschiedenen Konservierungs- und Sterilisationsverfahren eine unterschiedliche Denaturierung des biologischen Materials bewirken, darf man annehmen, daß die quantitativ unterschiedliche Angreifbarkeit für Trypsin ein Ausmaß für die Schädigung durch die einzelnen Verfahren darstellt.

Praktisches Vorgehen:

Die mit den verschiedenen Verfahren behandelten Präparate wurden in Segmente von etwa 1 cm^2 zerlegt und anschließend gewogen. Daraufhin erfolgte eine weitere Zerkleinerung mit der Schere in etwa 1 mm^2

große Stückchen. Je Klappensegment Aortenklappe bzw. Dura wurden 10 mg Trypsin in 5 ml Pufferlösung unter leichtem Rühren auf dem Magnetrührer zugesetzt. Nach 12 Stunden Trypsin-Einwirkung wurde der Überstand abpipettiert und der Rückstand zweimal ausgewaschen mit anschließendem leichtem Zentrifugieren. Das Waschwasser wurde zusammen mit dem Überstand auf 10 ml aufgefüllt.

5.4 Methodik der Hydroxyprolinbestimmung (Verfahren nach Stegemann)

Die Reaktion, die als spezifischster und empfindlichster Nachweis von Hydroxyprolin in der Literatur beschrieben wird, wurde schon 1933/34 von Lang, Waldschmidt-Leitz und Akabori erarbeitet (15, 34). Grundlage der Hydroxyprolinbestimmung ist die Umwandlung des Hydroxyprolins in Pyrrol durch Decarboxylierung und Wasserabspaltung mit anschließender Reaktion des Pyrrols mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (Deniges 1910, 6), wobei sich ein roter Farbst. bildet. Von den verschiedenen Nachweismethoden, die diese Reaktion zur Grundlage haben, (Methode von Neumann und Logan, 21, Meth. von Martin und Axelrod, 17, Meth. von Prockop und Udenfriend, 26, und Meth. von Stegemann, 32), wurde sich für die Methode von Stegemann (1958) entschieden, beider Hydroxyprolin durch Oxydation in leicht saurem Milieu nachgewiesen wird. Der Literatur nach zu urteilen, findet die Methode von Stegemann am häufigsten Anwendung, ist relativ schnell durchführbar und soll verlässliche Werte liefern. Die Übertragbarkeit der Methode auf Sehnengewebe war von Rauskolb (28) geprüft worden, der gleichzeitig systematische Untersuchungen über Störfaktoren anstellte, die von den an der Reaktion beteiligten

Substanzen wirksam werden können. Er fand dabei, daß bei genauer Arbeitsanweisung die Fehlerbreite bei $\pm 5\%$ liegt. $\pm 1 - 2\%$ sollen dabei allein durch die Hydroxyprolinbestimmung bedingt sein, der übrige Fehleranteil soll durch die Unhomogenität des Sehnengewebes verursacht werden.

Vorgehen bei der Hydroxyprolinbestimmung: Für die eigentliche Hydroxyprolinbestimmung war zunächst eine Hydrolyse des bereits in Überstand und Rückstand differenzierten Materials notwendig. Von Rauskolb (28) war in einem Vergleich zu zwei anderen Hydrolyseverfahren (einmal mit 0,5 M Perchlorsäure, zum anderen als alkalische Hydrolyse mit 0,5 % NaOH) festgestellt worden, daß eine komplette Hydrolyse des Sehnengewebes am günstigsten mit 25 % HCl bei 110°C und 20 Stunden Einwirkungs-dauer im Brutschrank erreicht wird.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine HCl-Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurden 2 ml des Überstandes und der gesamte Rückstand mit je 2 ml 25-proz. HCl in Ampullen eingeschmolzen und 4 Stunden im Hydrolysator bei 110° und 2 atü hydrolysiert.

Nach der Hydrolyse wurden die Ansätze mit Citrat-Acetat-Puffer versetzt und mit dem Titrator (Titrator und Autoburette Copenhagen) auf pH 6 eingestellt. Die mit Cialit behandelten Proben mußten zur Beseitigung des Phenolrotindikators über eine kurze Amberlite-Säule (Amberlite IRA 410, Serva, in Transfusionsschlauch, Durchmesser 3 mm, 100 mm Höhe) gegeben werden.

Da durch die Hydrolyse ein bräunliches Hydrolysat entsteht, das schwarz-braune Flocken enthält (Anteil von Huminkohle), wurde bei allen Proben eine Filtration durch einfache Papierfilter vorgenommen.

Die nach Hydrolyse soweit hergestellten Ansätze wurden nach Angaben von Stegemann wie folgt weiterverarbeitet:

Je 2 ml Probeansatz und 1 ml Chloramin-T-Lösung wurden gut gemischt und 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Zugabe von 2 ml 4 M Perchlorsäure, gut geschüttelt und 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Zugabe von 1 ml Paradimethylaminobenzaldehydlösung, gut geschüttelt und für 15 Minuten in ein Wasserbad von 60°C gestellt.

Hinterher Abkühlung unter fließendem Wasser.

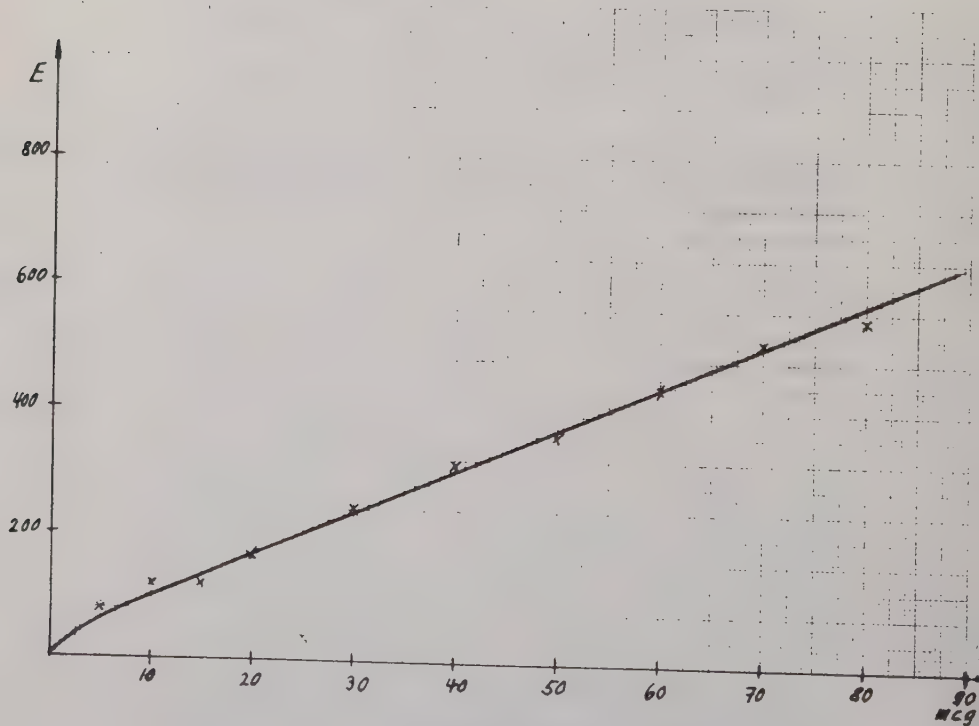
Der hierbei gebildete rote Farbstoff wurde mit dem Filter Hg 578 nm am Eppendorf-Photometer ^{x)} abgelesen. Als Kontrolle diente ein Standardwert mit bekanntem Hydroxyprolingehalt.

x) Fa. Netheler und Hinz, Hamburg

6.0

ER G E B N I S S E

Mit 20 mg L (-) Hydroxyprolin in 100 ml 0,00 1 N HCL als Stammlösung wurde eine Eichkurve erstellt, auf der die gewonnenen Extinktionen der Proben in mgr abgelesen werden konnten. Anschließende Multiplikation entsprechend den Verdünnungen und Berechnung auf 1 g Klappeneinwaage.



Eichkurve für Hydroxyprolin

Die Untersuchungsergebnisse sind im Tabellenanhang im einzelnen aufgeführt.

In den nachfolgenden Tabellen 1 und 2 ist der prozentuale Hydroxyprolinanteil des Überstandes vom Gesamt-Hydroxyprolingehalt angegeben:

$$\bar{X} = \frac{\text{HPL}_{\bar{U}} \cdot 100}{\text{HPL Ges.}}$$

Angegeben sind die Mittelwerte $\bar{X}$, Varianz V und Streuung $\pm S$ für die je 6 verschiedenen Gruppen von Herzklappen und Duren.

Im einzelnen bedeuten:

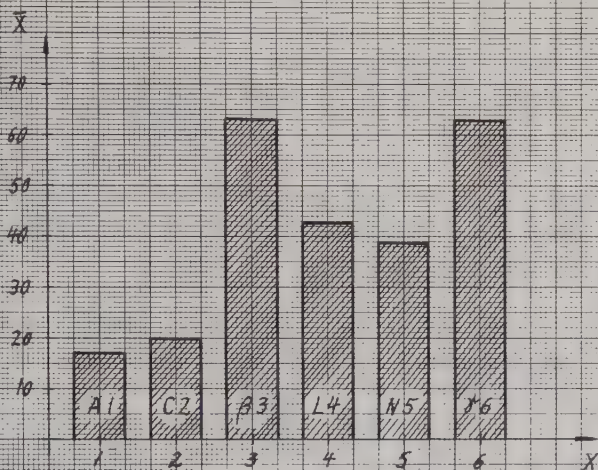
Hypro	=	Hydroxyprolingehalt
Ü	=	Überstand
R	=	Rückstand
Ges	=	Gesamt
Ä ₁	=	Äthylen
C ₂	=	Cyalit
Beta ₃	=	Betapropiolacton
L ₄	=	Lyophilisation
N ₅	=	Nativ
Gamma ₆	=	Gammastrahlenbehandelt

Tab. 1 Ergebnisse der Herzklappen

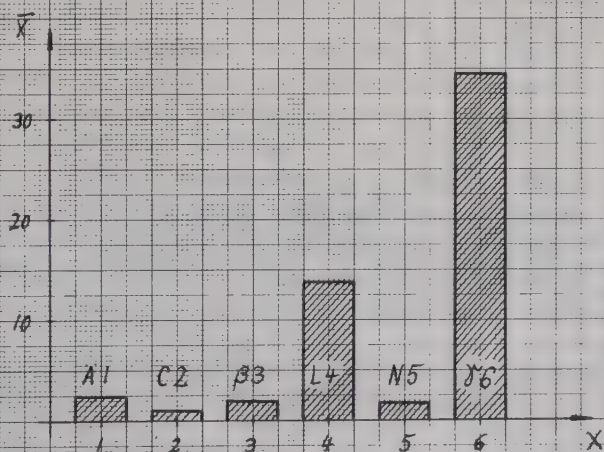
	N	$\overline{x}$	v	$\pm s$
Ä 1	20	$\overline{x}_1 = 17,28$	54,36	7,37
C 2	20	$\overline{x}_2 = 20,24$	68,88	8,30
Beta 3	20	$\overline{x}_3 = 63,28$	190,83	13,81
L 4	20	$\overline{x}_4 = 42,54$	100,47	10,02
N 5	20	$\overline{x}_5 = 38,73$	41,64	6,45
Gamma 6	20	$\overline{x}_6 = 63,30$	179,61	13,40

Tab. 2 Ergebnisse der Dura

	N	$\overline{x}$	v	$\pm s$
Ä 1	15	$\overline{x}_1 = 2,42$	0,93	0,97
C 2	20	$\overline{x}_2 = 1,05$	0,12	0,35
Beta 3	20	$\overline{x}_3 = 1,81$	0,48	0,70
L 4	20	$\overline{x}_4 = 10,39$	46,77	6,84
N 5	20	$\overline{x}_5 = 1,57$	0,11	0,34
Gamma 6	20	$\overline{x}_6 = 34,65$	200,67	14,17



1. Abb.: Mittelwerte für Herzklappen



2. Abb.: Mittelwerte für Durc

S T A T I S T I S C H E A U S W E R T U N G E N

Beurteilung der Kollagenschädigung von Herzklappen und Duren nach vorausgegangenem Konservierungsprozeß mit statistischen Methoden.

Da die Mittelwerte die einzelnen Messungsreihen charakterisieren, beurteilt man 2 voneinander unabhängige Messungsreihen mittels der Differenz, welche ihre Mittelwerte aufzeigen. In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, ob die Differenz der Mittelwerte noch als Zufallsquantum oder als echter Unterschied aufgefaßt werden kann. Dazu bedienen wir uns statistischer Methoden.

Die Varianz oder die Quadratwurzel daraus, die Streuung, ist ein Maß für die Abweichung der einzelnen Werte vom Mittelwert. Auf unsere Untersuchungen übertragen heißt das, daß bei gleichen Mittelwerten zweier Stichproben aber verschiedener Varianz in der Regel einzelne Herzklappen aus der Stichprobe mit der größeren Varianz weniger stark oder stärker geschädigt werden, als die der anderen Stichprobe mit der kleineren Varianz. Ist die Varianz wesentlich größer, so kann der Fall auftreten, daß einige Herzklappen nach Behandlung mit dem entsprechenden Konservierungsstoff unbrauchbar geworden sind, unter unserer Voraussetzung, daß die Höhe des Überstandes ein Maß für die Schädigung bildet (statistische Methoden und ihre Anwendungen von Erwin Kreyszig, 13).

Zwischen den einzelnen Mittelwerten unserer Messungsreihen bestehen Unterschiede. Um die Differenz zwischen

den 6 Mittelwerten auf Signifikanz zu prüfen, wurde in dieser Arbeit als Grundlage der Scheffé-Test (S-Methode) genommen. Dieser beruht auf der Konstruktion von Konfidenzintervallen. (35) Scheffé bewies, daß die Wahrscheinlichkeit $1 - \alpha$ beträgt, daß alle denkbaren Kontraste durch eine Menge von Konfidenzintervallen überdeckt werden, die gegeben sind durch

$$\hat{L} - S\hat{\sigma}_L \leq L \leq \hat{L} + S\hat{\sigma}_L$$

worin $S^2 = (k-1)F_{\alpha; k-1, n-k}$

und $\hat{\sigma}_L^2 = MQI \sum_j \frac{c_j^2}{n_j}$ ist.

Differenzen der Stichprobenmittel für Herzklappen

	$\bar{x}_3$	$\bar{x}_4$	$\bar{x}_5$	$\bar{x}_2$	$\bar{x}_1$
$\bar{x}_6$	0,02	20,76	24,57	43,06	46,02
$\bar{x}_3$	:	20,74	24,55	43,04	46,00
$\bar{x}_4$	:	:	3,81	22,34	25,26
$\bar{x}_5$	:	:	:	18,49	21,45
$\bar{x}_2$	:	:	:	:	2,96

Die Differenzen der Stichprobenmittel sind mit dem Wert $C = S \cdot \hat{\sigma}_L$ zu vergleichen. Ist die Differenz größer als dieser Wert, so ist der Unterschied als signifikant, ungefähr gleich, dann als zweifelhaft und echt kleiner dann als nicht signifikant anzusehen.

Scheffé-Test für Herzklappen

$$K = 6; \quad K - 1 = 5; \quad \alpha = 0,05$$

$$F_{0,95} ; \quad 5,114 = 2,30$$

$$S^2 = 5 \cdot 2,30 = 11,5 \Rightarrow S = 3,34$$

$$\hat{\sigma}_2^2 = MQI \cdot \sum \frac{c_i^2}{r_i} = 106,7 \cdot 0,3 = 32$$

$$\hat{\sigma}_2 = \sqrt{32} = 5,66$$

$$C = S \cdot \hat{\sigma}_2 = 3,34 \cdot 5,66 \approx 19$$

$$\text{Kontrast: } \bar{X}_6 + \bar{X}_3 + \bar{X}_4 - \bar{X}_5 - \bar{X}_2 - \bar{X}_1$$

$$L_1 = \hat{L}$$

Die Differenzen der Stichprobenmittel sind mit c = 19 zu vergleichen.

Differenzen der Stichprobenmittel für Dura

	$\bar{X}_4$	$\bar{X}_1$	$\bar{X}_3$	$\bar{X}_5$	$\bar{X}_2$
$\bar{X}_6$	24,26	32,23	32,84	33,08	33,60
$\bar{X}_4$		7,97	8,58	8,82	9,34
$\bar{X}_1$			0,61	0,85	1,37
$\bar{X}_3$				0,24	0,76
$\bar{X}_5$					0,52

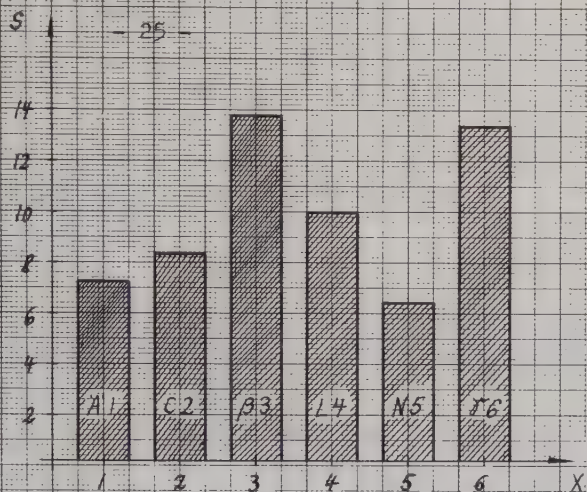
$$\text{Kontrast: } L_1 = \hat{L} = \bar{X}_6 + \bar{X}_4 + \bar{X}_1 - \bar{X}_3 - \bar{X}_5 - \bar{X}_2$$

$$S = 3,34$$

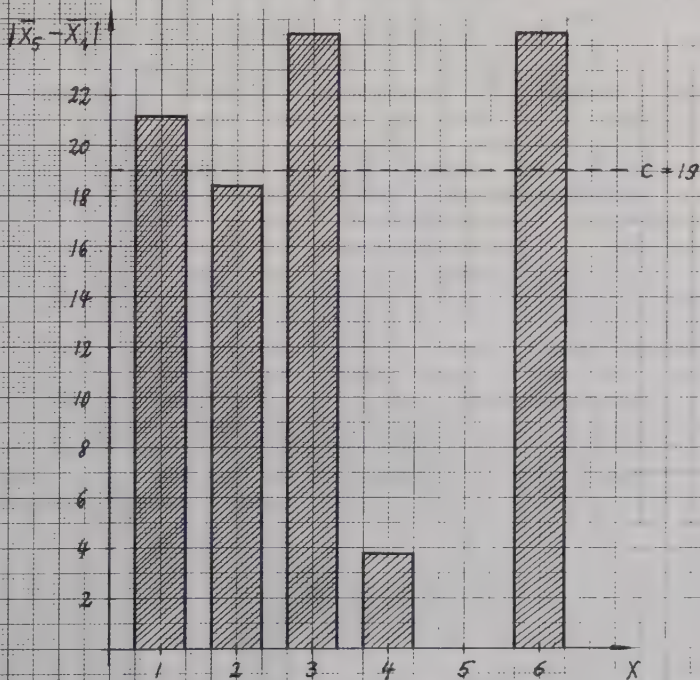
$$\hat{\sigma}_2^2 = 33,45 \cdot 0,3 = 9,5 \Rightarrow \hat{\sigma}_2 = 3,1$$

$$C = S \cdot \hat{\sigma}_2 = 3,34 \cdot 3,1 \approx 10$$

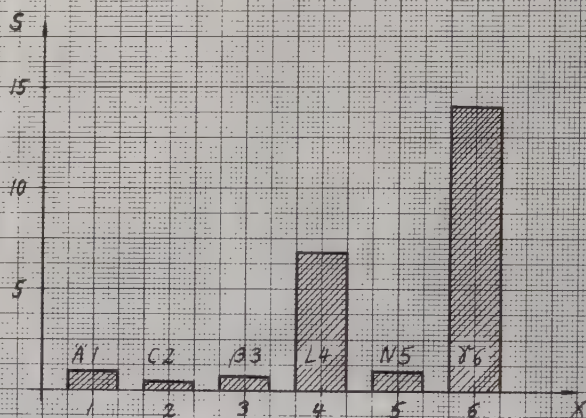
Die Differenzen der Stichprobenmittel sind mit c = 10 zu vergleichen.



3. Abb.: Streuung für Herzklappen.

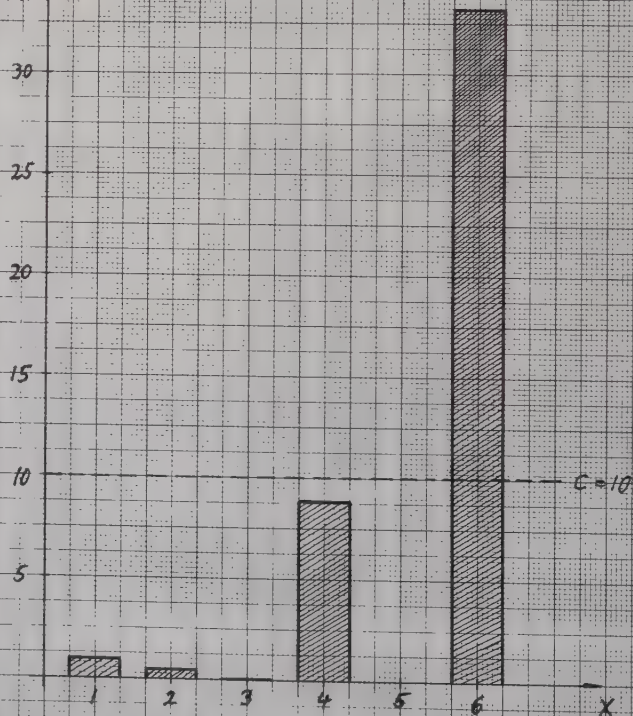


4. Abb.: Differenz der Mittelwerte $\bar{X}_i$ im Vergleich mit $\bar{X}_5$.



4. Abb.: Streuung für Dura

$|\bar{X}_5 - X_i|$



5. Abb.: Differenz der $\bar{X}_i$ im Vergleich mit $\bar{X}_5$

DISKUSSION

Die zur Präparation von homologen und heterologen Transplantaten aus kollagenem Gewebe angewandten Konservierungs- und Sterilisationsverfahren rufen morphologisch nachweisbare Veränderungen am Gewebe hervor (10, 12).

In der Bemühung, ein chemisches Verfahren zu finden, das eine differenzierte Aussage über den Grad der Kollagenschädigung an diesen Geweben aufzeigen soll, wurde gleichsam als Parameter die Tatsache herangezogen, daß natives Kollagen durch Verdauungs-Proteasen kaum gespalten wird (27). (Rapoport 902). Man kann sich leicht vorstellen, daß das Kollagen durch die angewandten Sterilisations- und Konservierungsverfahren in seinem ursprünglichen Molekularen Aufbau verändert wird und dadurch ^{für} die Verdauungs-Proteasen - in unserem Fall Trypsin - leicht angreifbar wird.

Wenn man jetzt unterstellt, daß die verschiedenen Verfahren sowohl quantitative als auch qualitative Änderungen im molekularen Gefüge des Kollagens bewirken, darf man mit Recht annehmen, daß daraus auch eine quantitativ unterschiedliche Angreifbarkeit für Trypsin resultiert, durch die man dann ein Schädigungsmaß für die einzelnen vorbehandelten Transplantate erhalten kann.

In unserem Falle stellt somit der prozentuale Hydroxyprolinegehalt des Überstandes bezogen auf den Gesamthydroxyprolinegehalt des Klappensegmentes,

einen durchaus brauchbaren Parameter für die Kollagenschädigung dar.

Zunächst soll noch einmal die Anwendbarkeit der Methode der Hydroxyprolinbestimmung auf die einzelnen kollagenen Materialien erörtert werden.

Für seine Untersuchungsergebnisse an menschlichem Sehnengewebe errechnete Rauskolb einen Fehler von $\pm 1 - 2 \%$, der allein durch die Hydroxyprolinbestimmung bedingt sein soll. Dieser Fehler muß auch bei den vorliegenden Ergebnissen angenommen werden.

Durch die Inhomogenität des Sehnengewebes soll noch ein weiterer Fehler von etwa $3 - 4 \%$ hinzukommen. Sicherlich ist dieser Fehler, der durch die Inhomogenität des Gewebes bedingt sein soll, wiederum bei Herzklappen und menschlicher Dura anders einzuschätzen. So wurde für die Nativpräparate der Herzklappen ein durchschnittlicher Hydroxyprolingehalt von $X = 7,80 \text{ mgr/gr KE}$ errechnet mit einer Streuung von $\pm S = 3,81$

Für die Nativduren betrug dieser Wert $X = 37,35 \text{ mgr/1 gr KE}$ mit einer Streuung von $\pm S = 7,60$

Die Untersuchungsergebnisse des prozentualen Anteils des Überstandes am Gesamthydroxyprolingehalt zeigen bei

$$\left[\frac{\text{HPL}_{\text{ü}}}{\text{HPL Gesamt}} \cdot 100 \right]$$

den Herzklappen 2 von den nativen Klappen als Bezugswert deutlich abweichende Gruppen:

Die Gamma-sterilisierten und die mit Beta-Propiolacton behandelten Klappen zeigen einen signifikant höheren Anteil von Hydroxyprolin im Überstand nach der Trypsin-Verdauung. Dies würde heißen, daß diese beiden Behandlungsverfahren offensichtlich stärkere Schäden an den Klappensegmenten hervorriefen, als dies bei den mit den anderen Verfahren behandelten Klappen der Fall war.

Bei der Lyophilisation wird, im Vergleich zu den nativen Klappen, kein signifikant höherer Anteil von Hydroxyprolin im Überstand gemessen. Demnach würde die Lyophilisation offensichtlich allein keinen zusätzlichen Schaden verursachen. Der schon relativ hohe Hydroxyprolinanteil im Überstand der nativen Klappen wäre dadurch zu erklären, daß die Aufbewahrung der Klappensegmente auch ohne Behandlung bereits eine erkennbare Schädigung hervorruft.

Bei den mit Äthylenoxid in Kombination mit Lyophilisation und bei den mit Cialit behandelten Klappen findet sich ein signifikant geringerer Hydroxyprolinanteil im Überstand. Dieser signifikant geringere Hydroxyprolinanteil im Überstand weist auf eine geringere Schädigung des Herzklappengewebes hin. Andererseits muß man aber auch annehmen, daß der signifikant geringere Hydroxyprolinanteil im Überstand bei der Äthylenoxidbehandlung teilweise auf eine intensivere Vernetzung des Kollagens zurückzuführen ist, die die Trypsin-Wirkung verdeckt. Welche chemischen Vorgänge bei der Cialit-Wirkung eine Rolle spielen, kann bisher nicht entschieden werden.

Die Ergebnisse bei den mit den gleichen Konservierungs- und Sterilisationsverfahren behandelten Test-

gruppen von menschlicher Dura lassen folgendes erkennen:

Die Gamma-sterilisierten Duren sind deutlich stärker geschädigt worden als die Duren der übrigen Behandlungsgruppen, da der Hydroxyprolinanteil des Überstandes wesentlich höher liegt als bei den anderen Behandlungsgruppen.

Dieses Ergebnis entspricht dem signifikant höheren Hydroxyprolinanteil im Überstand bei den Gamma-sterilisierten Herzklappen.

Ein allerdings noch nicht als signifikant zu betrachtender Unterschied des Hydroxyprolinanteiles im Überstand im Vergleich zu den Nativpräparaten liegt bei den nur lyophilisierten Durapräparaten vor. Dies würde auf eine relativ höhere Schädigung der lyophilisierten Duren im Vergleich zu den lyophilisierten Herzklappen hinweisen. Sicherlich zu berücksichtigen ist bei solch einem Vergleich aber auch der unterschiedliche hohe Gehalt von Hydroxyprolin von Herzklappen und Duren sowie die unterschiedlich große Inhomogenität des kollagenen Gewebes. Immerhin ist aber der errechnete Schädigungsgrad bei lyophilisierter Dura wesentlich geringer als bei den Gamma-sterilisierten Duren.

Einen nicht signifikanten Unterschied im Vergleich zur Nativgruppe zeigen die mit Äthylenoxid und Gialit behandelten Duren. Dies weicht etwas von den Ergebnissen bei den Herzklappen ab, da bei diesen ein signifikant geringerer Hydroxyprolinanteil im Überstand gefunden worden war.

Aber die nach dem methodisch getesteten Verfahren gefundene Beurteilung zeigt immerhin, daß durch eine

Behandlung mit Äthylenoxid und Cialit keine zusätzliche Schädigung des kollagenen Gewebes der Duren hervorgerufen wurde.

Aufgrund der Ergebnisse der beiden vorliegenden Untersuchungsgruppen können also die Behandlung mit Cialitlösung nach Carpentier und die Lyophilisation mit anschließender Äthylenoxidbegasung als eine brauchbare Methode zur Konservierung und Sterilisation von Herzklappen und Duren angesehen werden.

Was die Behandlung des kollagenen Gewebes mit Lyophilisation bei vorausgegangener Sterilisation durch Einlegen in eine 1-prozentige Beta-Propiolactonlösung angeht, so finden sich bei Herzklappen und menschlicher Dura völlig differente Ergebnisse. Bei den mit Beta-Propiolacton behandelten Duren findet sich - entgegen dem Ergebnis bei den Herzklappen - kein signifikant höherer Anteil von Hydroxyprolin im Überstand im Vergleich zu den Nativ-Duren. Eine einleuchtende Begründung für diese unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse kann nicht gegeben werden, zumal die methodischen Untersuchungen unter streng gleichen Arbeitsbedingungen durchgeführt wurden. Eine teilweise Begründung kann damit versucht werden, daß die Homogenität des Gewebes und der Hydroxyprolinanteil bei Herzklappengewebe und menschlicher Dura unterschiedlich sind und damit eine quantitativ unterschiedliche Einwirkung von Beta-Propiolacton möglich wird.

Im Folgenden soll ein kurzer Vergleich der von Hehrlein (10) gefundenen morphologischen Bilder der verschieden vorbehandelten Herzklappen mit der chemisch ermittelten Beurteilung der Gewebsschädigung angestellt werden.

Das lediglich lyophilisierte Herzklappengewebe zeigt einen überwiegend gleichen Aufbau wie das native Gewebe.

Dies würde auch grob dem Ergebnis der chemischen Untersuchungen entsprechen, das bei den lyophilisierten Herzklappen einen nicht signifikanten und bei den Dura-Präparaten einen noch nicht signifikanten Unterschied des Hydroxyprolinanteils im Überstand erkennen ließ.

Bei dem lyophilisierten und mit mit Gamma-Strahlen sterilisierten Gewebe kann chemisch und auch histologisch die stärkste Gewebsschädigung angenommen werden. Eine etwas geringere, aber doch deutliche Strukturveränderung ähnlichen Ausmaßes findet sich bei dem mit Äthylenoxid und den mit Beta-Propiolactonlösung behandelten Klappen. Die chemische Beurteilung bei dem mit Äthylenoxid behandelten Gewebe wies auf eine deutlich geringere Gewebsschädigung hin, wofür im histologischen Bild aber kein Anhalt besteht.

Diese Diskrepanz zwischen Morphologie und chemischem Ergebnis würde die Annahme bekräftigen, daß bei der Äthylenoxideinwirkung eine Vernetzung des Kollagens eine Rolle spielt. Eine geringere morphologische Schädigung ist nach 4 Wochen langer Aufbewahrung in äquilibrierter Cialitlösung zu erkennen, wobei hauptsächlich herdförmige Auflockerungen der Kollagenfaserbündel gefunden werden. Der Schluß einer deutlichen Korrelation zwischen chemischem und histologischem Befund kann daraus aber noch nicht gezogen werden.

Aufgrund der vorliegenden methodischen Untersuchungen kann somit gesagt werden, daß - abgesehen von

dem differenten Ergebnis der mit Beta-Propiolacton behandelten Herzklappen und Durapräparate - mit dem getesteten chemischen Verfahren ein hinreichender Anhalt für das Schädigungsausmaß an kollagenem Gewebe erhalten werden kann. Eine sichere Beurteilung kann aber nicht durch das chemische Verfahren allein erfolgen. So wird z. B. der relativ niedrige Hydroxyprolingehalt im Überstand bei den mit Äthylenoxid behandelten kollagenen Geweben vermutlich durch eine intensivere Vernetzung des Kollagens verursacht. Das histologische Bild braucht aber durchaus keine geringeren Strukturveränderungen anzuzeigen. Ein Verzicht auf ein Behandlungsverfahren kann somit nur aufgrund verschiedener methodischer Ergebnisse ausgesprochen werden. So kann man z. B. bei Betrachtung der chemischen Untersuchungsergebnisse bei Gamma-sterilisiertem kollagenem Gewebe eine starke Schädigung annehmen, was auch noch durch das histologische Bild bekräftigt wird.

Die Frage, ob das geschilderte Verfahren auch allgemein geeignet ist, quantitativ unterschiedliche Schädigungen an kollagenem Fasergewebe anzuzeigen, kann letzten Endes aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse nur mit Einschränkung bejaht werden.

Schwierigkeiten ergeben sich nicht so sehr durch die Methode selbst, sondern vor allem wegen der Inhomogenität der verschiedenen kollagenen Gewebe. Ferner ist von Bedeutung, daß bei der zum Teil noch nicht genau geklärten chemischen Einwirkungsweise eine Kollagenschädigung durch eine niedrige Hydroxyprolinmenge im Überstand maskiert werden kann, (z. B. durch eine Vernetzung des Kollagens).

Das Verfahren kann aber, im Zusammenhang mit anderen Beurteilungsmöglichkeiten, wie z. B. Morphologie und Auftreten von klinischen Störungen eine wesentliche Ergänzung in der Beurteilung von Konservierungs- und Sterilisations-bedingten Schäden an kollagenen Transplantaten sein.

Z u s a m m e n f a s s u n g

In der vorliegenden Arbeit wird die Tauglichkeit eines chemischen Verfahrens methodisch untersucht, das eine differenzierte Aussage über den konservierungs- und sterilisations-bedingten Schädigungsgrad an kollagenem Gewebe geben soll. Im Vergleich zweier Untersuchungsreihen - einmal mit heterologen Aortenklappen, zum anderen mit menschlicher Dura - wird auf die Frage eingegangen, ob es möglich ist, quantitativ unterschiedliche Schädigungen an kollagenem Fasergewebe chemisch festzustellen.

Es wurden 5 verschiedene Verfahren zur Konservierung und Sterilisation von kollagenen Transplantaten, die heute meist angewandt werden, untersucht. Dies sind die einfache Lyophilisation, dann die Lyophilisation in Kombination mit Äthylenoxidbegasung oder Beta-Propiolacton oder nachfolgende Gammastrahlung und schließlich die Feuchtkonservierung durch Aufbewahrung in Cialitlösung.

Als Grundlage für ein chemisches Schädigungsmaß wurde die Tatsache herangezogen, daß natives Kollagen durch Verdauungsproteasen kaum gespalten wird, während denaturiertes Kollagen sein ursprüngliches molekulares Gefüge verliert und für Trypsin leicht angreifbar wird.

Zur eigentlichen Hydroxyprolinbestimmung wurde nach dem Verfahren von Stegemann vorgegangen, das Hydroxyprolin durch Oxydation in leicht saurem Milieu nachweist.

Aufgrund der gefundenen Untersuchungsergebnisse und im Vergleich der Ergebnisse bei heterologen Aortenklappen und menschlicher Dura muß gesagt werden, daß eine Beurteilung der Gewebsschädigung durch das chemische Verfahren allein nicht vorgenommen werden sollte.

Das Verfahren bietet aber eine gute Ergänzung zu anderen Beurteilungsmöglichkeiten wie Morphologie und Klinik.

Die Frage, ob das geschilderte Verfahren allgemein geeignet ist, quantitativ unterschiedliche Schädigungen an kollagenem Fasergewebe anzuzeigen, kann letzten Endes nicht sicher bejaht werden. Schwierigkeiten ergeben sich z. B. durch die Inhomogenität der verschiedenen Gewebe und durch die Möglichkeit, daß durch Vernetzung des Kollagens die Trypsin-Wirkung verdeckt werden kann.

8.0

T A B E L L E N A N H A N G

Angegeben sind: Gewicht der Klappeneinwaage in Gramm, die dazugehörigen Extinktionen aus Überstand und Rückstand (Ü bzw. R), die Absolutwerte des Hydroxyprolins im Überstand und Rückstand in mg berechnet auf 1g Klappeneinwaage. (die Verdünnungen sind entsprechend berücksichtigt), der Gesamthydroxyprolingehalt in mgr und der Prozentanteil des Überstandes am Gesamthydroxyprolin.

N	Gewicht in g	Ext. Ü.	Ext. R.	Ü in mg/ 1 g K.E.	R in mg/ 1 g K.E.	Ges. Hypro mg/ 1 g K.E.	% Ant C.
1	,34416	,361	1,829	2,900	6,090	8,990	32,25
2	,14019	,235	1,262	5,347	9,269	14,616	36,58
3	,70909	,398	1,620	1,692	2,679	4,371	38,70
4	,40018	,311	1,637	2,178	4,731	6,909	31,52
5	,21078	,209	1,220	2,607	6,256	8,863	29,41
6	,04439	,088	,699	4,504	13,512	18,016	25,00
7	,28433	,267	1,094	2,457	3,510	5,967	41,17
8	,10664	,215	,769	5,387	6,184	11,571	46,55
9	,22474	,248	,973	2,886	4,218	7,104	40,62
10	,27772	,306	1,019	3,150	3,510	6,660	47,29
11	,07710	,361	1,293	6,998	1,253	2,251	44,33
12	,38427	,343	1,182	2,600	3,120	5,720	45,45
13	,35613	,222	1,110	1,680	2,940	4,620	36,36
14	,49051	,394	1,314	2,436	2,740	5,176	47,06
15	,54400	,298	1,118	1,601	1,921	3,522	45,45
16	,33676	,318	1,190	2,138	3,552	6,290	42,52
17	,23216	,250	1,309	3,010	5,605	8,815	34,14
18	,28979	,304	1,374	2,932	5,002	7,934	36,95
19	,20090	,318	1,372	4,597	7,206	11,803	58,94
20	,29883	,245	1,305	2,254	4,509	6,763	33,32

Tab. 1 a - Unbehandelte Aortenklappen

L	Gewicht in g	Ext.Ü.	Ext.R.	Ü in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges.Hydro. mg/ 1 g KE.	% Ant. Ü.
1	,17015	,338	1,412	6,750	8,805	15,555	43,39
2	,09166	,195	1,110	5,177	13,080	18,257	28,35
3	,17187	,322	1,710	5,519	10,167	15,686	35,18
4	,26224	,441	1,655	5,238	6,667	11,905	43,99
5	,10003	,204	1,093	4,995	11,488	16,483	30,30
6	,11400	,246	1,358	5,919	12,716	18,635	31,76
7	,17479	,350	1,330	6,006	8,151	14,157	42,42
8	,19204	,453	1,529	7,280	8,502	15,782	46,12
9	,25286	,640	1,800	9,480	7,603	17,083	55,49
10	,24638	,579	1,694	8,100	7,371	15,471	52,35
11	,16981	,245	1,393	3,969	8,820	12,789	31,03
12	,13954	,219	1,533	4,296	11,625	15,931	26,96
13	,15645	,252	1,323	4,632	8,946	13,578	34,11
14	,24820	,685	1,786	10,954	7,698	18,652	58,72
15	,32064	,514	1,798	5,287	5,971	11,258	46,96
16	,19746	,455	1,311	7,590	7,084	14,674	51,72
17	,22570	,462	1,557	6,534	7,398	13,932	46,89
18	,22800	,423	1,524	5,803	7,117	12,920	44,91
19	,23092	,649	1,582	8,064	5,611	13,675	58,96
20	,13614	,349	1,333	7,340	10,459	17,799	41,23

Tab. 2 a - Lyophilisierte Aortenklappen

B	Gewicht in g	Ext. Ü.	Ext. R.	Ü in mg/ l g K.E.	R in mg/ l g K.E.	Ges. Hypro mg/ l g K.E.	% Ant. Ü.
1	,11573	,428	,466	11,232	2,505	13,737	81,76
2	,16660	,567	,670	11,700	3,000	14,700	79,59
3	,16218	,724	1,035	16,440	5,460	21,920	75,00
4	,27693	,789	,837	12,183	4,332	16,515	73,27
5	,06339	,295	,749	11,827	9,619	16,159	75,39
6	,11137	,337	,933	8,297	7,395	21,450	55,10
7	,07781	,262	1,178	9,637	14,649	15,052	53,10
8	,20518	,409	1,157	6,007	5,405	24,286	39,68
9	,15209	,250	1,055	4,599	6,504	11,492	52,97
10	,13070	,359	,991	8,032	6,885	11,103	41,42
11	,24715	,701	1,248	13,130	5,130	14,917	53,84
12	,16410	,769	,859	19,183	5,237	18,260	39,58
13	,24995	1,008	1,302	20,000	5,400	24,420	78,55
14	,12677	,323	,809	7,289	6,107	25,400	78,74
15	,74129	,600	1,020	2,881	1,252	4,133	69,71
16	,28343	,625	1,123	8,096	3,766	11,862	68,25
17	,25612	,741	1,222	10,725	4,173	14,894	71,93
18	,28377	,569	1,367	6,864	5,209	12,073	56,84
19	,18282	,483	1,104	8,190	5,460	13,650	60,00
20	,11754	,363	,817	9,137	5,907	15,044	60,74

Tab. 3 a - Mit Beta-Propiolacton behandelte Aortenklappen

<i>g</i>	Gewicht in g	Ext. Ü	Ext.R.	C in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges. Hypro mg/ 1 g KE.	% Ant. Ü.
1	,05522	,177	,366	,814	,398	1,212	67,16
2	,09203	,293	,828	9,201	7,602	16,833	54,83
3	,11658	,328	,829	7,713	5,999	13,712	56,25
4	,12654	,381	,967	8,097	6,794	14,891	54,37
5	,06844	,200	,367	8,035	3,068	11,103	72,36
6	,09061	,244	,571	6,618	4,301	10,919	60,60
7	,14204	,438	,975	7,920	6,336	14,256	55,55
8	,14500	,404	1,366	7,579	9,990	17,569	43,13
9	,11184	,288	,838	7,152	6,481	13,633	52,46
10	,16433	,507	1,073	9,576	6,000	15,656	61,16
11	,28042	,840	1,044	13,350	3,417	16,767	79,62
12	,24235	,571	,875	7,519	3,131	10,650	70,60
13	,13636	,590	,541	15,759	2,602	18,361	85,82
14	,26937	,767	1,055	10,695	3,450	14,145	75,60
15	,36930	,757	1,197	8,302	3,240	11,542	71,92
16	,54132	,849	1,578	6,900	3,404	10,304	66,96
17	,12000	,581	1,016	16,660	8,330	24,990	66,66
18	,26000	,714	1,051	10,500	3,601	14,361	73,53
19	,29739	,632	1,044	1,560	3,225	10,705	70,09
20	,03848	,551	,545	25,900	9,222	35,202	75,80

Tab. 4 a - Mit Gamma-Strahlen behandelte Aortenklappen

Ä	Gewicht in g	Ext. Ü	Ext. R	Ü. in mg/ 1 g KE.	R. in mg/ 1 g KE.	Ges. Hypro mg 1 g KE.	% Ant. Ü.
1	,08396	,105	1,207	3,272	13,090	16,362	19,99
2	,15495	,194	1,597	3,225	12,255	15,480	20,83
3	,16168	,126	1,730	1,034	12,970	14,832	12,50
4	,12095	,130	1,596	2,604	15,694	18,376	14,60
5	,04902	,065	0,894	2,039	16,312	18,351	11,11
6	,04045	,057	0,890	2,472	19,776	22,240	11,11
7	,15100	,143	1,727	2,997	13,906	16,983	17,64
8	,22015	,184	1,846	2,210	9,988	12,250	18,51
9	,15919	,211	1,497	3,454	11,616	15,072	22,91
10	,24300	,315	1,773	3,062	8,836	11,918	25,86
11	,43272	,367	3,926	2,425	11,319	13,744	17,64
12	,16791	,172	2,348	2,975	17,850	20,825	14,28
13	,19441	,130	2,674	1,542	17,219	18,761	8,21
14	,29953	,171	3,086	1,498	12,820	14,518	10,46
15	,25900	,472	1,721	5,790	8,106	13,896	41,66
16	,14474	,213	2,026	3,795	17,250	21,045	18,03
17	,26066	,319	2,724	3,255	13,213	16,468	19,76
18	,22637	,184	2,856	3,205	15,876	18,081	12,19
19	,21534	,163	2,774	1,786	13,895	15,681	11,38
20	,12246	,100	1,246	2,040	9,996	12,036	16,94

Tab. 5 a - Mit Äthylenoxid begaste Mortenklappen

C	Gewicht in g	Ext. Ü	Ü. Ext. R.	Ü. in mg/ l g KE.	R. in mg/ l g KE.	Ges. Hypro mg l g KE.	% Ant. Ü.
1	,11147	,056	1,190	1,345	10,495	11,840	11,65
2	,18410	,045	1,132	,678	8,688	9,366	7,23
3	,38700	,091	1,431	,645	4,128	4,773	13,51
4	,03608	,033	,500	2,771	9,144	11,915	23,25
5	,09522	,030	,769	1,049	6,923	7,912	13,15
6	,09576	,082	1,296	2,088	13,363	15,451	13,51
7	,14523	,105	1,416	1,892	10,664	12,556	15,06
8	,25432	,165	2,159	1,670	10,807	12,477	13,38
9	,15531	,081	1,366	1,286	9,002	10,288	12,50
10	,17167	,108	1,532	1,600	10,359	12,920	12,38
11	,47041	,237	1,433	1,378	3,349	4,727	29,15
12	,49946	,188	1,606	1,000	3,800	4,800	20,83
13	,34790	,183	1,563	1,363	5,223	6,506	20,59
14	,69181	,273	2,008	1,404	3,600	5,004	28,05
15	,57629	,196	1,569	,778	3,157	3,935	19,77
16	,82038	,307	1,668	1,058	2,413	3,471	30,48
17	,62712	,282	1,849	1,272	3,577	4,849	26,23
18	1,71097	,296	1,305	,671	1,554	2,025	32,13
19	,22906	,366	1,606	1,150	2,033	3,183	36,12
20	,30652	,152	1,000	1,059	3,227	4,286	24,70

Tab. 6 a - Mit Cialit behandelte Aortenklappen

N	Gewicht in g	Ext. Ü.	Ext. R.	U in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges. Hypro mg/ 1g KE.	% Ant. Ü.
1	,55953	,079	,446	,476	52,682	33,158	1,43
2	,32206	,069	,514	,427	43,936	44,363	,96
3	,34201	,089	,511	,567	40,394	40,901	1,36
4	,36437	,117	,492	,789	38,254	39,043	2,02
5	,35215	,095	,513	,621	39,898	40,219	1,53
6	,34512	,108	,453	,724	35,060	35,784	2,02
7	,38400	,108	,502	,651	35,677	36,328	1,79
8	,37182	,096	,756	,588	59,168	59,756	,98
9	,34669	,106	,486	,721	37,786	36,501	1,87
10	,32886	,077	,510	,494	42,571	43,065	1,14
11	,37529	,073	,407	400	27,712	28,112	1,42
12	,38086	,074	,588	,407	25,469	25,810	1,57
13	,34128	,081	,409	,513	30,620	31,133	1,64
14	,38803	,098	,523	,592	37,602	38,194	1,54
15	,37200	,101	,429	,622	29,973	30,595	2,03
16	,33188	,084	,508	,546	42,033	42,579	1,28
17	,34653	,088	,369	,559	25,827	26,386	2,11
18	,36046	,091	,514	,572	39,255	39,827	1,43
19	,35042	,091	,456	,589	34,245	34,834	1,68
20	,36139	,100	,496	,640	37,356	37,996	1,68

Tab. 1 b - Unbehandelte Dura

L	Gewicht in g	Ext. Ü.	Ext.R.	Ü in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges. Hypro mg/ 1 g KE.	% ant. Ü.
1	,06263	,028	,200	,499	67,061	67,560	,73
2	,06271	,260	,162	11,262	52,625	63,885	17,62
3	,06260	,133	,151	5,192	48,722	53,914	9,62
4	,06412	,084	,164	1,852	52,246	54,098	3,42
5	,06713	,165	,182	6,331	55,862	62,153	10,17
6	,06788	,162	,200	6,077	61,874	67,951	6,94
7	,06052	,084	,214	1,962	75,182	77,144	2,54
8	,06440	,153	,191	6,017	62,112	68,129	8,83
9	,06535	,052	,226	1,243	74,216	75,459	1,64
10	,06669	,050	,204	1,125	64,477	65,602	1,71
11	,06506	,179	,148	7,109	46,111	53,220	13,35
12	,06471	,248	,156	11,494	46,679	60,173	19,10
13	,06502	,269	,109	11,247	31,529	42,776	26,29
14	,06375	,219	,125	9,121	57,659	46,780	15,49
15	,06566	,165	,113	6,570	55,775	40,551	16,30
16	,06435	,145	,177	5,833	56,721	62,354	9,03
17	,06555	,170	,154	6,664	47,962	54,646	12,19
18	,06571	,124	,137	4,611	45,164	47,775	9,65
19	,06542	,168	,152	5,312	44,556	49,968	10,65
20	,06500	,094	,189	5,175	45,385	48,558	6,53

Tab. 2 b - Lyophilisierte Dura

β	Gewicht in g	Ext. $\bar{u}$.	Ext. R.	$\bar{u}$ in mg/ l g KE.	R in mg/ l g KE.	Ges. Hypro mg/ l g KE.	% Ant. $\bar{u}$.
1	,13531	,071	,346	1,062	59,123	60,186	1,76
2	,12794	,076	,332	1,221	59,794	61,015	2,00
3	,13570	,096	,349	1,612	59,690	61,302	2,62
4	,11800	,073	,302	1,271	57,203	58,474	2,17
5	,12055	,057	,305	,830	56,823	57,652	1,43
6	,12635	,063	,353	,940	65,691	66,630	1,41
7	,11809	,082	,286	1,482	53,550	54,832	2,70
8	,11599	,090	,279	1,724	52,591	54,315	3,17
9	,11332	,078	,343	1,434	70,155	71,589	2,00
10	,12220	,057	,324	1,584	60,517	62,101	2,55
11	,11089	,050	,296	,676	59,068	59,744	1,13
12	,11866	,077	,316	1,369	60,256	61,625	2,22
13	,11600	,082	,297	1,509	56,897	58,406	2,58
14	,11424	,065	,332	1,094	66,964	68,056	1,60
15	,11523	,043	,317	,434	62,484	62,918	,68
16	,12785	,041	,356	,391	65,702	66,093	,59
17	,12363	,061	,361	,910	69,967	70,877	1,28
18	,12582	,058	,333	,795	60,401	61,596	1,29
19	,11425	,061	,358	,985	74,398	75,383	1,30
20	,11459	,075	,360	1,364	74,614	75,978	1,79

Tab. 3 b - Mit Beta-Propiolacton behandelte Dura

<i>d</i>	Gewicht in g	Ext. Ü.	Ext. R.	Ü in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges. Hypro mg/ 1 g KE.	% Ant. Ü.
1	,06440	,286	,073	12,151	18,634	30,765	39,43
2	,06038	,210	,050	9,213	9,937	19,150	48,10
3	,06060	,202	,045	8,767	8,251	17,013	51,51
4	,06425	,210	,047	8,156	8,560	17,218	50,28
5	,06254	,157	,082	6,396	22,386	28,782	22,22
6	,06370	,108	,102	4,023	29,827	33,850	11,88
7	,06200	,206	,060	8,770	13,710	22,480	39,01
8	,06170	,186	,052	7,901	11,345	19,246	41,05
9	,06442	,190	,053	7,162	10,866	18,628	41,66
10	,06068	,238	,084	10,506	23,896	34,402	30,53
11	,06253	,162	,104	6,695	31,175	37,870	17,67
12	,06208	,266	,103	11,679	30,606	42,285	27,61
13	,06146	,108	,081	4,068	22,779	26,847	15,15
14	,06300	,192	,046	8,036	8,730	16,766	47,92
15	,06340	,224	,046	9,464	9,464	18,928	50,00
16	,06376	,205	,052	8,528	10,979	19,507	43,71
17	,06288	,188	,072	7,852	19,084	26,936	29,15
18	,06158	,171	,061	7,206	14,615	21,821	33,02
19	,06206	,289	,053	12,790	11,279	24,069	53,15
20	,06116	,194	,049	8,377	9,807	18,184	46,06

Tab. 4 b - Mit Gamma-Strahlen behandelte Dura

Ä	Gewicht in g	Ext.Ü.	Ext.R.	Ü in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges. Hypro mg/ 1 g KE.	% Ant. ü.
1	,06542	,100	,243	,535	80,251	83,786	4,20
2	,06248	,055	,239	1,501	82,426	83,927	1,70
3	,06129	,066	,248	2,040	87,290	89,329	2,20
4	,06136	,054	,243	1,426	85,561	86,987	1,60
5	,06137	,047	,232	1,120	81,473	82,593	1,30
6	,06138	,048	,240	1,222	83,904	85,126	1,40
7	,06572	,063	,269	1,807	89,014	90,821	1,90
8	,06313	,055	,235	1,485	79,994	81,479	1,80
9	,06185	,078	,241	2,627	84,074	86,702	3,30
10	,06208	,077	,224	2,618	77,320	79,937	3,27
11	,06320	,056	,227	1,483	76,741	78,224	1,89
12	,06406	,087	,233	3,025	78,052	81,076	3,73
13	,06475	,099	,266	3,571	89,575	93,147	3,83
14	,06231	,061	,257	1,806	89,873	91,679	1,96
15	,06235	,062	,228	1,804	77,787	79,591	2,26

Tab. 5 b - Mit Äthylenoxid begaste Dura

G	Gewicht in g	Ext. J.	Ext. R.	U in mg/ 1 g KCl.	R in mg/ 1 g KCl.	Ges. Hypro mg/ 1 g KCl.	Cont. J
1	,24865	,050	,544	,501	32,148	32,449	,92
2	,25522	,042	,296	,213	28,697	28,910	,73
3	,24981	,033	,230	,150	19,815	19,965	,75
4	,24500	,043	,300	,204	27,347	27,551	,74
5	,24376	,040	,277	,205	30,708	30,973	,66
6	,24059	,043	,262	,201	22,929	23,130	,86
7	,24576	,048	,291	,305	26,245	26,550	1,14
8	,25365	,059	,359	,419	39,819	40,238	1,04
9	,24248	,049	,255	,309	20,826	21,135	1,46
10	,25657	,059	,302	,414	26,309	26,723	1,54
11	,25930	,040	,308	,193	26,803	26,996	,71
12	,24500	,049	,272	,309	24,280	24,569	1,25
13	,24170	,038	,277	,181	25,051	25,212	,71
14	,24452	,042	,261	,204	23,106	23,310	,87
15	,25766	,033	,298	,146	25,809	25,955	,56
16	,24309	,051	,200	,304	25,094	25,428	1,31
17	,25049	,057	,297	,399	26,348	26,747	1,45
18	,24426	,045	,206	,307	25,792	26,099	1,17
19	,24740	,055	,207	,351	23,256	23,607	1,48
20	,25661	,069	,351	,536	31,955	32,491	1,64

Tab. 6 b - Mit Cialit behandelte Dura

L I T E R A T U R A N G A B E N

1. Altmann, R.:
Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu
den Zellen
Veit & Co., Leipzig (1890)
2. Carpentier, A.:
Traitement des lésions valvulaires aortique par
des greffes hétéroplastique
R. Foulon et Co., Paris (1966)
3. Collins, H. A., and Foster, J. H.:
The establishment of an arterial bank using lyo-
philization and ethylene oxide sterilization
Amer. Surg. 20: 820 - 826 (1954)
4. Conway, H., and Stark, R.:
Gewebekonservierung II
VEB Ver. Volk und Gesundheit, Berlin (1965)
5. Davies, M., Lessof, M. M., Roberts, C. I.,
and Ross, D. N.:
Homograft replacement of the aortic valve Follow-
up studies in 12 patients
Lancet 1: 926 - 929 (1965)
6. Denigés, G.:
Farbreaktion des Pyrrols
Z. analyt. Chem. 49: 317 - 319 (1910)
7. Flosdorf, E. W., and Mudd, S.:
Procedure and apparatus for preservation in
"lyophile" form of serum and other biological
substances
J. Immunol. 29: 389 - 425 (1935)

8. Hehrlein, F. W.:
Die Herstellung homologer und heterologer Herzklappentransplantate mit einer verbesserten Gefriertrocknungsanlage
Langenbecks Arch. klin. Chir. 318: 202 - 208 (1967)
9. Hehrlein, F. W.:
Eine Halterung für Aortenklappentransplantate zum homologen und heterologen Ersatz der Mitralis
Langenbecks Arch. klin. Chir. 324: 154 - 164 (1969)
10. Hehrlein, F. W., Schmitt, W. und Papastavrou, N.:
Morphologische Untersuchungen an heterologen Herzklappentransplantaten unter verschiedenen Sterilisationsbedingungen
Thoraxchirurgie 17: 244 - 251 (1969)
11. Hufnagel, C. A., Rabil, P. J., and Reed, L.:
A method for the preservation of arterial homo- and heterografts
S. Forum 162 - 168, Philadelphia (1953)
12. Korb, G., Runge, D. und Arkenau, C.:
Histologische Untersuchungen von lyophilisierten, mit Gammastrahlen sterilisierten kollagenen Geweben
Mels. Med. Mitt. 41: 39 - 48 (1967)
13. Kreyszig, E.:
Statistische Methoden und ihre Anwendung
Verlag Vandenhoeck & Ruprecht (1968)
14. Lam, C. R., Aram, H. H., and Munnell, E. R.:
An experimental study of aortic valve homografts.
J. Surg. Gyn. and Obst. 94: 129 - 135 (1952)

15. Lang, K.:
Eine Mikromethode zur Bestimmung des Prolins und
des Oxyprolins
Z. physiol. Chem. 219: 148 - 154 (1933)
16. Macris, J. A., Sloan, H., and Orebaugh, J. E.:
The use of cobalt ⁶⁰ as a sterilizing agent for
aortic homografts
S. Forum 268 - 273, Philadelphia (1954)
17. Martin, C. J., and Axelrod, A. E.:
A modified method for determination of hydroxy-
proline
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 83: 461 - 462 (1953)
18. Mc Henry, M. M., Smeloff, E. A., and Hattersly,
P. G.:
Complications of Heart Valve Replacement.
Embolism, Bleeding, Hemolysis
Calif. Medic. 109: 1 - 8 (1968)
19. Murray, G.:
Aortic valve transplants
Angiology 11: 99 - 102 (1960)
20. Murray, G., Roschlau, W., and Loughheed, W.:
Homologous aortic-valve-segment transplants as
surgical treatment for aortic and mitral in-
sufficiency
Angiology 7: 466 - 471 (1956)
21. Neumann, R. E., and Logan, M. A.:
The determination of Collagen and Elastin in
Tissues
J. Biol. Chem. 186: 549 - 556 (1950)

22. Philips, C. R.:
Gaseous sterilization: ethylene oxide, in Reddish
G. F. Antiseptics, disinfectants, fungicides,
and chemical and physical sterilization.
2nd edition, p. 754, London (1957)
23. Pia, H. W.:
Lyophilisierte Dura
B. Braun - Arbeitstagung, Kassel-Wilhelmshöhe
(30./31. 5. 1969).
24. Pia, H. W.:
Indikation zur Duraplastik unter besonderer Be-
rücksichtigung lyophilisierter Dura.
Mels. Med. Mit. 41: 61 - 69 (1967)
25. Pickering, B.:
The preparation and storage of aortic valve
homografts
Guy's Hosp. Rep. 115: 105 - 117 (1966)
26. Prockop, D. W., and Udenfriend, S.:
A specific method for the analysis of hydroxy-
proline in tissues and urine
Analyt. Biochem. 1: 228 - 239 (1960)
27. Rapoport, S. M.:
medizinische Biochemie
VEB Verl. Volk und Gesundheit, Berlin (1962)
28. Rauskolb, R.:
Untersuchungen zur Methodik der Bestimmung von
Hydroxyprolin im Sehngewebe
Inaug. Diss. Gießen (1967)
29. Ross, D. N.:
Homoplastischer Ersatz der Aortenklappe.
XVII. Int. Kongr. Europ. Ges. für Herz- und
Kreislaufchirurgie, London (1968)

30. Senning, A.:
Zur Chirurgie der Mitralinsuffizienz
Dtsch. med. Wschr. 89: 594 (1964)
31. Senning, A. und Largadier, R.:
Homologe Transplantation von Mitralklappen beim
Menschen: Transplantatbeschaffung und erste
Anwendungen
Melsunger Med. Mitt. 41: 79 - 84 (1967)
32. Stegemann, H.:
Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-
T und P-Dimethylaminobenzaldehyd
Z. physiol. Chem. 310: 41 - 45 (1958)
33. Szilagyi, D. E., Overhulse, P. R., Shonnard,
C. P., and LoGrippe, G. A.:
The sterilization of human arterial homografts
with Beta-propiolactone.
Surg. Forum 5: 244 - 252 (1954)
34. Waldschmidt-Leitz, E., Akabori, U. S.:
Bestimmung von Oxyprolin
Z. physiol. Chem. 224: 187 - 192 (1934)
35. Weber, E.:
Grundriß der biologischen Statistik für Medizi-
ner und Biologen
Verlag

Herrn Prof. Dr. L. Róka danke ich für
die Überlassung des Themas und seinen
sachverständigen Rat.

Seinem ehemaligen Oberarzt, Herrn Dr. med.
H. Haas, gilt mein Dank für die freundliche
Unterstützung während der Arbeit.

Herrn Dozent Dr. F. W. Hehrlein sei an dieser
Stelle für die Überlassung der lyophilisier-
ten und mit einem Konservierungsverfahren
behandelten Präparate gedankt.

L E B E N S L A U F

Ich wurde als erster Sohn des kaufmännischen Angestellten Wilhelm Skuginna und seiner Ehefrau Berta Skuginna geb. Joost am 30. April 1943 in Frankfurt/M. geboren.

Meine Eltern zogen ein Jahr nach meiner Geburt nach Blasbach im Kreis Wetzlar, wo ich den größten Teil meiner Kindheit verbrachte und auch die Volksschule bis zum Eintritt in das Gymnasium besuchte.

1963 legte ich die Reifeprüfung am Goethe-Gymnasium in Wetzlar ab.

Nach dem Abitur wurde ich als Wehrpflichtiger zur Bundesmarine eingezogen.

Im Frühjahr 1965 begann ich an der Justus-Liebig-Universität in Gießen mit dem Medizinstudium.

Nach Vorphysikum und ärztlicher Vorprüfung (Frühjahr 1968) schloß ich Anfang Juli 1971 das Medizinstudium in Gießen ab.

Nach Beendigung meiner Medizinalassistentenzeit am Jung-Stilling-Krankenhaus in Siegen möchte ich zunächst auf einer neuro-chirurgischen Abteilung arbeiten

Gießen, September 1972

Armin Skuginna

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641 - 77449